

M.Pau Bretó · Ruth Cebolla · Álvaro García de Yzaguirre · Ramón Carreres

# SELECCIÓN ASISTIDA POR MARCADORES DE VARIEDADES DE ARROZ CON ALTO VALOR CULINARIO.

Departamento del Arroz  
(Instituto Valenciano de  
Investigaciones Agrarias - IVIA).  
Ronda del País Valencià, 36.  
46410 Sueca (Spain).

## Introducción

El Departamento del Arroz del IVIA (anteriormente Centro Agronómico del Arroz, Granja o Estación Arrocería) lleva prácticamente cien años dedicado a obtener nuevas variedades de arroz que satisfagan las demandas del sector. Inicialmente, este Centro se creó para evitar "falladas" del nivel de la que se produjo en los arrozales valencianos en 1911, probablemente como consecuencia de un brote de *pyriculariosis* (causada por el hongo *Magnaporthe oryzae*); con posterioridad, ha dedicado principalmente sus esfuerzos a obtener variedades que combinaran las mejores características agronómicas, para favorecer la más alta productividad en diferentes regiones arroceras de España (adaptación del ciclo vegetativo y reproductivo a nuestras condiciones climáticas, talla reducida, arquitectura de la planta, etc.)

Otro de los objetivos de mejora al que se ha prestado una atención especial ha sido la calidad del grano, tanto en lo referente a la calidad industrial como a los parámetros de apariencia y a las características sensoriales del grano cocido. Existen varios problemas para seleccionar de acuerdo a la calidad en las primeras etapas de un programa de mejora: por una parte, se dispone de cantidades de muestra

insuficientes para realizar algunas de las evaluaciones; por otra, ciertas determinaciones son laboriosas y no permiten el procesado de un número elevado de muestras; y, por último, el elevado grado de variabilidad genética que se encuentra en las primeras generaciones. Por ello, generalmente no se inician las evaluaciones de estos caracteres hasta la cuarta o quinta generación, con lo cual se pueden haber descartado genotipos interesantes en las etapas previas.

En este trabajo se describe cómo el uso de marcadores moleculares nos permite efectuar una selección más eficiente y temprana de algunos de estos caracteres: la textura y aspecto del grano cocido (esponjosidad, brillo, humedad superficial, integridad y adherencia entre granos), y la presencia de aroma.

## Características del grano cocido: contenido en amilosa.

La evaluación de las características sensoriales del grano cocido puede realizarse mediante pruebas de cata, que son lentas y requieren gran cantidad de muestra. Como alternativa, se pueden analizar determinadas características físico-químicas relacionadas con los atributos sensoriales, como son el contenido de amilosa, la resistencia al álcali, la consistencia del gel, la textura, la viscosidad y adhesividad (Carreres y Bretó, 2006).

De todas ellas, se considera que

el factor más determinante en las características del arroz cocido es la proporción de amilosa respecto a amilopectina en el almidón (Webb, 1985; Carreres, 1988). Basándose en el contenido en amilosa (C.A.), las variedades se clasifican en cinco grupos: los llamados arroces glutinosos o waxy, con un CA entre el 0 y el 5%, muy bajo (5.1-12.0%), bajo (12.1-20%), intermedio (20.1-25%) y alto (superior al 25%). Las variedades con contenido muy bajo o bajo dan lugar a granos húmedos, brillantes y pegajosos cuando están cocidos, que se parten longitudinalmente en X y se desintegran si se sobrecuecen. Los tipos de contenido alto cuecen secos, esponjosos y duros, y se endurecen aún más al enfriarse. Los de contenido intermedio tienen la esponjosidad de los de alto contenido, pero se mantienen tiernos una vez fríos. La mayoría de las variedades españolas y europeas con grano de tipo comercial japonica (arroces de grano redondo o medio) tienen un C.A. bajo o intermedio, mientras que las del tipo comercial indica (arroces de grano largo) tienen generalmente contenidos intermedios o altos. Sin embargo, existen algunas excepciones como las variedades Bomba y Albufera en España, o Carnaroli, Karnak, Carnise y Carnise Precoce en Italia; estas variedades representan el estándar de máxima calidad en sus países, y tienen todas ellas un C.A. alto, más propio de los arroces de grano largo.

El contenido de amilosa es una característica casi monogénica, con-



trolada mayoritariamente por múltiples alelos en el gen *waxy* (*wx*) en el cromosoma 6 (Kumar y Khush, 1988; Ayres y col., 1997; Fan y col., 2005). Se cree que el enzima codificado por este gen, la Almidón Sintasa Unida al Gránulo (GBSS), es el responsable de la última etapa de polimerización de la síntesis de amilosa en los gránulos de almidón del arroz. Se ha comprobado que este gen está también relacionado con los otros parámetros de cocción mencionados anteriormente (Carreres y col., 1996; Tan y col., 1999; Bao y col., 2000).

Existen diversos métodos para determinar el C.A.: por espectrofotometría (ISO, 1987), colorimetría de barrido diferencial (Mestres y col., 1996) o por espectroscopia en el infrarrojo cercano (Villareal y col., 1994). Pero todos ellos requieren bastante cantidad de grano del que obtener harina, y son laboriosos y costosos. Actualmente, sin embargo, es posible utilizar marcadores asociados al gen *wx*, como se viene haciendo de manera habitual en los programas de mejora australiano, de EEUU y del International Rice Research Institute (IRRI), para seleccionar de forma rápida los genotipos con el C.A. deseado (Bergman y col., 2001; Christopher y col., 2004; McClung y col., 2005).

## Aroma

Algunas variedades de arroz despiden aroma después de la cocción: son los arroces aromáticos, de gran tradición en el este asiático y cuya demanda ha aumentado recientemente en los mercados occidentales. Generalmente, el aroma es similar a "palomitas de maíz" o "nueces tostadas" aunque existen variedades con aromas similares a chocolate y arroz tostado; también puede ser patente en el grano crudo y en la planta. Aunque entre los componentes volátiles del arroz cocido se han encontrado más de 100 compuestos, la 2-acetil-1-pirrolina es el principal responsable (Buttery y col. 1986): los arroces aromáticos contienen entre 100-2000

ppb, frente a menos de 20 ppb en los no aromáticos.

En Asia se cultivan y consumen varios cientos de variedades de este tipo, aunque sólo se exportan Basmati (India y Pakistán) y Khao Dawk Mali o Jasmine (Thailandia). En Japón, el equivalente es Koshihikari, con un sabor diferente por el alto contenido de ácido aspártico y glutámico. También se han obtenido recientemente variedades aromáticas en Argentina, EEUU y Australia, aunque con menor aceptación que las importadas. Respecto a Europa, aunque su demanda representa solo una pequeña parte del mercado, el creciente interés ha hecho que exista programas de mejora para la obtención de variedades aromáticas: en Italia se han registrado recientemente Apollo, Asia, Fragrance y Giglio (de alto C.A.), y Giano y Venere (de bajo C.A., la última con pericarpio negro); en España se han obtenido Delmar y Presen.

En la selección de variedades por el aroma se puede utilizar un sencillo test cualitativo en las primeras generaciones, que consiste en tratar tejido foliar o de grano descascarillado con una solución diluida de KOH, y oler. El inconveniente de este método es que el panel de catadores puede analizar un número limitado de muestras cada día, por ser la inhalación de KOH agresiva para la nariz; por otra parte, la valoración resulta bastante subjetiva. Además, hay una influencia ambiental en la cantidad de aroma presente (Kibria y col., 2008). Por todo ello, en generaciones avanzadas se utilizan métodos más precisos, pero más costosos, como la cromatografía gaseosa (Bergman y col., 2000). Para facilitar la selección, se ha incorporado a varios programas de mejora el uso de marcadores moleculares asociados al que parece el principal determinante: el gen *sk2*, en el cromosoma 8, que codifica el enzima Betaín-Aldehído Deshidrogenasa 2 (BAD2). Parece ser que también el locus *sk1* en el cromosoma 4 tiene un efecto sobre la produc-

ción de aroma, aunque en bastante menor grado (Garland y col., 2000; Cordeiro y col., 2002; Bradbury y col., 2005a y b; Sakthivel y col., 2009).

## Marcadores moleculares y su utilización en mejora.

Un marcador genético es cualquier característica heredable con variantes fácilmente diferenciables que, o bien se encuentra asociada (estadísticamente correlacionada) con un carácter de interés, o bien indica una región cromosómica concreta. Destacan los denominados marcadores moleculares, que revelan diferencias genéticas (alelos o haplotipos) que se pueden observar mediante diversas técnicas. Con los avances en la tecnología para extraer, caracterizar, amplificar y secuenciar ADN, la disponibilidad de marcadores moleculares se ha vuelto prácticamente ilimitada; así, por ejemplo, en arroz existen completas bases de datos públicas, como la de la Universidad de Cornell (<http://www.gramane.org>), que incluye más de 19.000 marcadores solo del tipo SSR. Esta clase de marcadores, llamados tanto SSR (Repeticiones de secuencia simple; Weber y May, 1989) como microsatélites, son frecuentemente utilizados por sus múltiples ventajas: alto nivel de polimorfismo, abundancia y ubicuidad, sencillez de la técnica y sensibilidad; y son también los empleados en este trabajo.

Los marcadores moleculares tienen numerosas aplicaciones en los estudios genéticos; en particular, en Mejora podemos destacar la identificación de genotipos (estudios de parentesco, análisis de paternidad, identificación de variedades o clones, ...) y la selección asistida por marcadores (MAS). Como ejemplo de la primera aplicación, en el Departamento del Arroz se utilizan para el reconocimiento de los híbridos F1: por un lado, porque a menudo resulta difícil distinguir de visu los híbridos de las autofecundaciones; pero además porque los marcadores permiten descartar los casos de polinización cruzada.



La MAS, por otra parte, consiste en seleccionar, indirectamente, los genotipos deseados mediante marcadores ligados a los genes de interés. Está indicada en caracteres de baja heredabilidad, o cuando la evaluación directa del carácter presenta dificultades de tipo práctico. El uso de MAS aumenta la eficacia del proceso por varias razones: se elimina el efecto ambiental que afecta a la selección fenotípica; se acelera el proceso de selección, pues se puede realizar el cribado en generaciones tempranas y en poblaciones de menor tamaño; y también se reduce el número de ciclos de selección (pues paralelamente se reduce el grado de heterocigosis). En arroz, se ha utilizado MAS con éxito para piramidar (acumular en una misma variedad) genes de resistencia específica a *Magnaporthe* y *Xanthomonas* (Sánchez y col., 2000; Narayanan y col., 2002), y más recientemente en mejora de la calidad: en los mencionados aroma y contenido en amilosa, en la elongación del grano en la cocción (Blight y col., 1995; Bergman y col., 2001.; Zhou y col., 2003; McClung y col., 2005), o para seleccionar las dimensiones del grano junto con una hoja bandera más ancha para aumentar la eficacia fotosintética (Wang y col., 2011).

### **Protocolo general para MAS**

La utilización de MAS tiene interés cuando se puede realizar el cribado inicial en un tamaño muestral importante, de modo que se puedan descartar todos aquellos genotipos que no van a presentar el carácter deseado. Por ello, hemos diseñado una metodología que nos permite analizar un gran número de individuos (entre 600 y 800 de cada población F2) de forma rápida y económica; para ello se combinan un protocolo de extracción muy sencillo en 2 pasos, con un sistema de homogeneización en placa.

Se germinan las semillas en bandejas con alvéolos rellenos de sustra-

to, con una disposición similar a la de las placas de muestreo: cada bandeja/placa contiene 96 individuos, distribuidos en 8 filas y 12 columnas, e identificados por su posición (Figura 1a). Cuando las plántulas alcanzan el estadio de 2 hojas, se corta un pedazo de tejido foliar (de aproximadamente 0.5 cm<sup>2</sup>) que se deposita en el pocillo correspondiente de la placa de muestreo (Fig. 1b), al que se han añadido pequeñas bolas de vidrio que servirán para la rotura del tejido al someter las placas a una fuerte agitación. Posteriormente, se lisan las células y se neutraliza la mezcla; el sobrenadante libre de tejido se transfiere a una nueva placa, y se congela hasta ser utilizado (Fig. 1c). Este extracto es muy crudo y no se puede conservar por un periodo prolongado, pero hemos comprobado que es perfectamente útil para el análisis de pocos marcadores SSR, tal como se requiere en MAS.

Se realiza la reacción de PCR apropiada para cada marcador en nuevas placas de 96 pocillos con una alícuota de extracto (Fig. 1d); los productos de la reacción se separan mediante electroforesis (Fig. 1e) y se visualizan con una sencilla tinción de plata (Ruiz y col., 2000). Para acelerar el proceso se utiliza multiplexing, es decir, en cada electroforesis se cargan dos tandas de 96 muestras.

La utilización de este protocolo nos ha permitido procesar un gran número de individuos en poco tiempo; de este modo, el cribado de las poblaciones F2 y trasplante del material seleccionado se completa en dos semanas. Únicamente aquellos individuos con el genotipo deseado en los genes que determinan las características buscadas son finalmente transplantados, debidamente identificados, a las balasetas en las que se cultivan para realizar las primeras fases de la selección en base a criterios agronómicos, tales como altura de la planta, duración del ciclo vegetativo y fecha de maduración, número y tamaño de las panículas, entre otros (Fig. 4); más adelante,

en parcelas experimentales, se realizarán los ensayos de producción en campo y de rendimiento industrial.

En todos los casos, se seleccionan preferentemente las plantas que tienen el mismo genotipo, en el marcador, que el parental donante del carácter (con un alto C.A., por ejemplo); es decir, los homocigotos, en los que el carácter está fijado y ya no variará en las generaciones siguientes. Pero tampoco descartamos los individuos heterocigotos, aunque son de menor interés, pues su descendencia aún presentará segregación en el carácter, y hay que repetir la MAS en las líneas F3 del año siguiente; pero se incluyen por si entre las plantas del primer grupo (sólo una cuarta parte de las plantas F2 son homocigotas) no se encuentran suficientes individuos que sean apropiados atendiendo al resto de criterios de selección.

### **Cruzamientos y estado actual de la selección para líneas con un contenido intermedio de amilosa**

Para obtener variedades con alto contenido en amilosa hemos realizado cruzamientos entre variedades muy productivas y de talla baja, pero de C.A. bajo (Jsendra, Sivert, Sarcet y Gleva, las 3 primeras obtenidas por el Departamento del Arroz del IVIA), con variedades de mayor C.A. italianas (Romolo, Cesare y Carnise Precoce) o españolas (Albufera, también una variedad del IVIA).

El cribado se ha realizado con un marcador SSR situado dentro del propio gen wx (Ayres y col., 1997), que es altamente polimórfico, como puede observarse en la Figura 1f, pues detecta fácilmente variantes alélicas en distintas variedades.

Para comprobar la efectividad del marcador wx en la selección de genotipos de elevado C.A., se realizó la determinación de la cantidad de amilosa presente en el grano mediante un análisis colorimétrico (ISO, 1987)



en algunas líneas F3 derivadas de plantas F2 seleccionadas por MAS. Los resultados se resumen en la Tabla 1. Tal como se esperaba, en ambos cruzamientos, las F3 descendientes de plantas F2 homocigotas para el alelo del parental que aumenta el carácter, mostraron un C.A. del mismo orden que este parental. Por el contrario, las F2 heterocigotas dieron lugar a F3 en las que el C.A. varió entre los valores de ambos parentales del cruzamiento; en tal caso, se realizó un nuevo ciclo de MAS, pero solo entre las F3 que mostraron buenas características agronómicas, y se seleccionaron únicamente las de genotipo homocigoto. Se demuestra, por lo tanto, que el marcador *wx* es un buen indicador del C.A. dentro de un cruzamiento, y que es un criterio eficaz para la selección de este carácter en las copiosas generaciones iniciales de un programa de mejora.

En este momento, disponemos de varias líneas F6 derivadas de 4 cruzamientos con las variedades italianas Romolo y Cesare, que van a ir a sus primeros ensayos de campo en la próxima campaña. También se han seleccionado líneas F4 y F3 de otros 3 cruzamientos (por Albufera y Carnise Precoce), que continúan el proceso de selección genealógica por criterios agronómicos. Además, se han obtenido líneas doble haploides (DH) de varios de estos cruzamientos, que también serán evaluadas en la próxima campaña.

#### **Cruzamientos y estado actual de la selección para arroces aromáticos**

Respecto a la selección de variedades aromáticas, hemos cruzado las variedades de grano largo Puntal y Cormorán, bien adaptadas y muy productivas en España, por las variedades aromáticas italianas Fragrance y Asia, también de grano largo.

Para la selección de genotipos aromáticos hemos utilizado dos marcadores SSR que flanquean al gen *sk2* (RM284 y RM42; un detalle de

**Tabla1:** Contenido en Amilosa (en %) en algunas variedades, y en dos de los cruzamientos en que se realizó MAS con el marcador *wx*. En las F3 de estos cruzamientos se indica el genotipo de los individuos F2 seleccionados: homocigotos como el parental de alto C.A., o heterocigotos.

VARIEDAD O CRUZAMIENTO	GENOTIPO EN EL MARCADOR <i>wx</i>	CONTENIDO EN AMILOSA (%)
Bomba		20.3
Albufera		25.5
Gleva		18.7
J Sendra		16.3
Romolo		23.9
J Sendra x Romolo, F3	Homoc. RR Heteroc. JR	21.3-23.3 15.8-22.9
Sivert		17.3
Cesare		21.3
Sivert x Cesare, F3	Homoc. CC Heteroc. SC	22.0-22.7 16.3-21.8

este último puede verse en la Fig. 3); y otros dos SSRs que flanquean a *sk1* (RM456 y RM241), y que han mostrado un buen grado de polimorfismo entre los parentales utilizados.

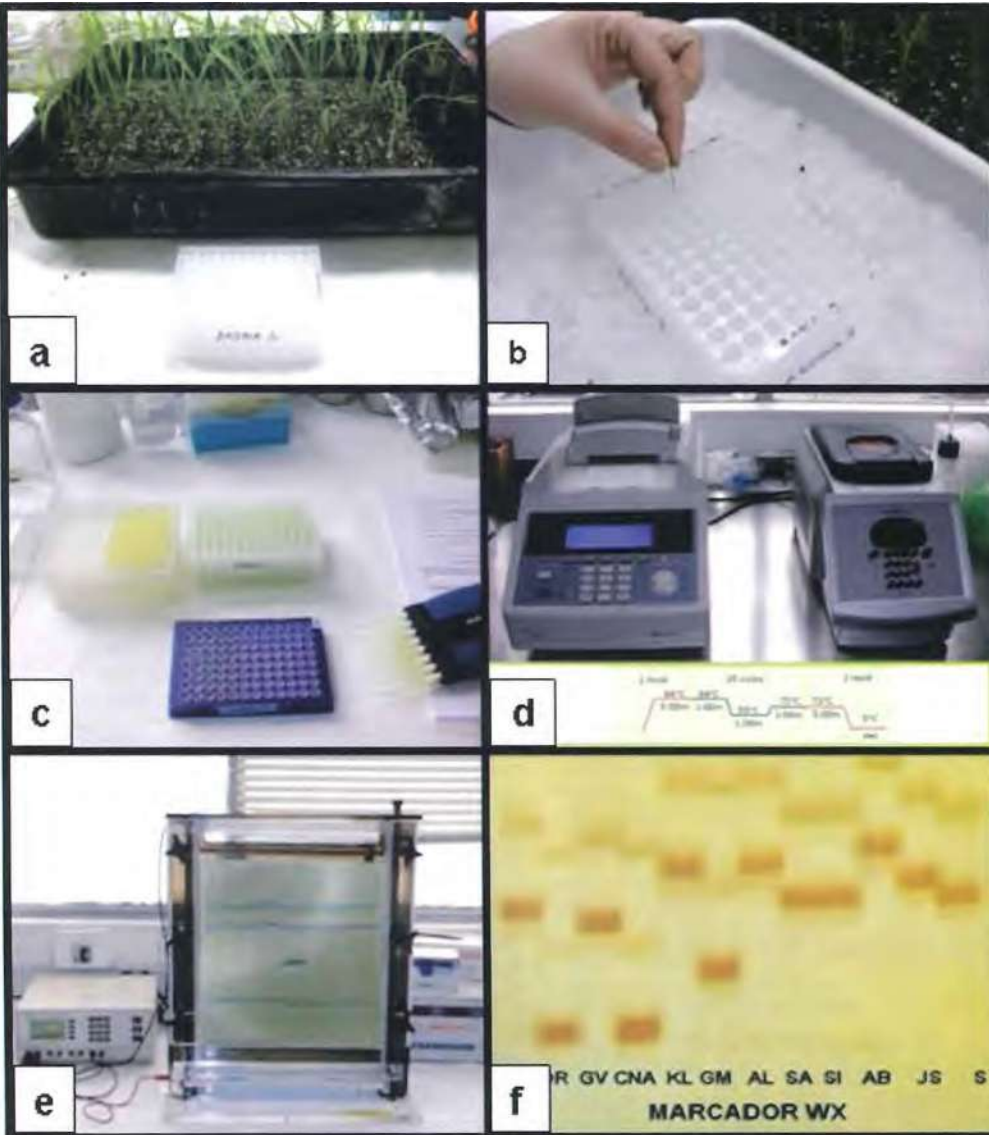
En este caso, se efectuó la selección de los genotipos aromáticos atendiendo a los dos marcadores que flanquean al gen que aporta la presencia de aroma: se trata de marcadores que se encuentran muy próximos a *sk2* y *sk1*, por lo que la probabilidad de que haya recombinación entre ellos y el gen es muy baja; por ello, podemos inferir con alta confianza el genotipo del gen a partir del genotipo de los marcadores. Sin embargo, puesto que es preferible el uso de un marcador dentro del gen, como ocurre en el caso de *wx*, en el futuro tenemos previsto ensayar marcadores SNP que se encuentren dentro de la secuencia de *sk2*.

Una comprobación realizada en la primera población en que se aplicó MAS para el aroma, (Cormorán x Fragrance) en 2009, mediante el sistema de cata olfativa, mostró que sólo el gen *sk2* tiene un efecto significativo en estos cruzamientos, por lo que en adelante únicamente se han analizado los marcadores que flanquean a este gen, y no a *sk1*. Estas pruebas también demostraron que la presencia de aroma solo podía ser detecta-

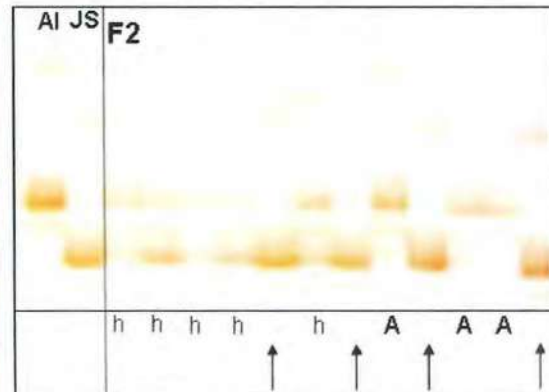
da consistentemente por el panel de catadores en los casos en que *sk2* estaba en homocigosis; cuando el gen está en heterocigosis, la producción de aroma es menor y no todos los catadores pueden confirmar su presencia. Con ello se comprueba que la MAS es un criterio de selección más efectivo y sensible. Sin embargo, la valoración del contenido en compuestos volátiles y aromáticos se realizará mediante técnicas más sensibles, como la cromatografía, en las generaciones avanzadas (F5 en adelante), en que el número de muestras a ensayar será mucho menor, para poder detectar diferencias más sutiles en cantidad y calidad del aroma.

El material más avanzado corresponde al cruzamiento Cormorán x Fragrance, del que se han seleccionado ya diversas líneas F5, y también se han realizado retrocruzamientos para acelerar la incorporación de las características de Cormorán. Disponemos también de líneas F4 y F3 de otros 4 cruzamientos, así como de algunas líneas DH, que acortarán el proceso de obtención de una nueva variedad.

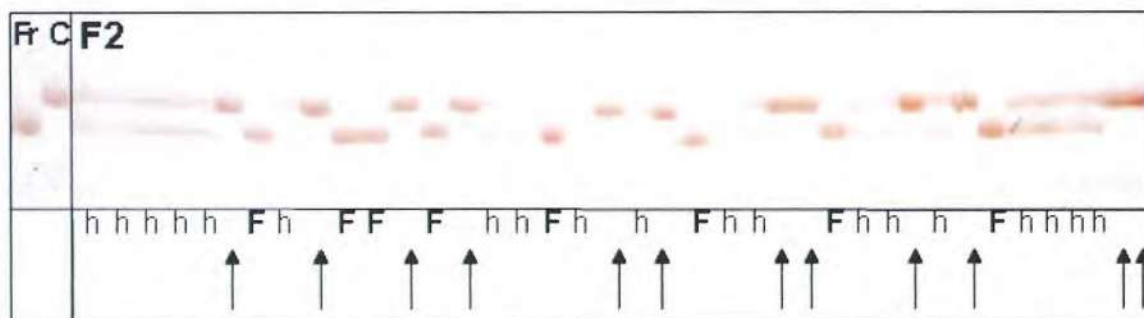




4  
**Figura 1:** Metodología para la selección asistida por marcadores:  
a) material vegetal a seleccionar germinado en bandejas de 96 muestras, clónicas de las placas para muestreo (identificación de los individuos);  
b) cosecha de material vegetal;  
c) placas con extracto crudo con ADN;  
d) termocicladores y perfil de PCR;  
e) electroforesis, y  
f) ejemplo de polimorfismo: el marcador wx amplificado en distintas variedades.



▲ **Figura 2:** Selección de individuos F2 con alto contenido en amilosa del cruzamiento entre Albufera (Al) y JSendra (JS): se seleccionaron aquellos que tienen el alelo de Albufera en el marcador wx (A: homocigotos; h: heterocigotos), y se descartaron el resto (indicados por una flecha).



▲ **Figura 3:** Selección de individuos F2 con grano aromático en el cruzamiento entre Cormorán (C) y Fragrance (Fr): se seleccionan aquellos que tienen el alelo de Fragrance (F: homocigotos; h: heterocigotos), en los dos marcadores que flanquean al gen *sk2*; y se descarta el resto. En la figura se muestran los resultados en el marcador RM42.



4  
**Figura 4:** Balsetas donde se transplanta el material seleccionado, para las siguientes fases de selección por criterios agronómicos.



## Agradecimientos

Este trabajo se ha realizado en el marco del proyecto RTA2008-00017-C02-00, financiado por el INIA. Los autores desean agradecer la colaboración de Dña. Amparo Hervás Martínez, Dña. Teresa Padrones Huguet, y D. Vicent Muñoz Marí en el manejo del material vegetal.

## Referencias

- Ayres N.M., McClung A.M., Larkin P.D., Bligh H.F.J., Jones C.A., Park W.D. 1997. *Microsatellites and a single-nucleotide polymorphism differentiate apparent amylose classes in an extended pedigree of US rice germplasm*. Theor. Appl. Genet. 94, 773-781.
- Bao J.S., Zheng X.W., Xia Y.W., He P., Shu Q.Y., Lu X., Chen Y., Zhu L.H. 2000. *QTL mapping for the paste viscosity characteristics in rice (Oryza sativa L.)*. Theor. Appl. Genet. 100, 280-284.
- Bergman C.J., Delgado J.T., Bryant R., Grimm C., Cadwallader K., Webb B. 2000. *A rapid gas chromatographic technique for quantifying 2-acetyl-1-pyrroline and hexanal in rice*. Cereal Chem. 77, 454-458.
- Bergman C.J., Delgado J.T., McClung A.M., Fjellstrom R.G. 2001. *An improved method for using a microsatellite in the waxy gene to determine amylose class*. Cereal Chem. 78, 257-260.
- Bligh H.F.J., Till R.I., Jones C.A. 1995. *A microsatellite sequence closely linked to the Waxy gene of Oryza sativa*. Euphytica 86, 83-85.
- Bradbury L.M.T., Fitzgerald T.M., Henry R.J., Jin N.Q.S., Waters D.E.L. 2005a. *The gene for fragrance in rice*. Plant Biotech. J. 3, 363-370.
- Bradbury L.M.T., Henry R.J., Jin N.Q.S., Reinke E.R.F., Waters D.E.L. 2005b. *A perfect marker for fragrance genotyping in rice*. Molec. Breed. 16, 279-283.
- Buttery R.G., Ling L.C., Mon T.R. 1986. *Quantitative analysis of 2-acetyl-1-pyrroline in rice*. J. Agric. Food Chem. 34, 112-114.
- Carreres R. 1988. *Estudio de los atributos de calidad del arroz*. pp. 823-842. En: Ente Risi (Ed), X Convegno Internazionale sulla Riscultura. Vercelli, Italia.
- Carreres R., Ballesteros R., Sendra J. 1996. *Notes on the amylose content used as rice grain quality index in Spain*. Cahiers Options Méditerranéennes. 15, 53-58.
- Carreres R., Bretó M.P. 2006. *Mejora de la calidad en el arroz*. pp. 199-219. En: Mejora genética de la calidad en plantas. Eds: Llácer G., Díez M.J., Carrillo J.M., Badenes M.; U.P.V., Valencia.
- Christopher M., Cordeiro G., Waters D., Henry R. 2004. *Marker assisted selection in rice improvement*. RIRDC publication 04/011 ([www.rirdc.gov.au/fullreports/index.html](http://www.rirdc.gov.au/fullreports/index.html))
- Cordeiro G.M., Christopher M.J., Henry R.J., REINKE R.F. 2002. *Identification of microsatellite markers for fragrance in rice by analysis of the rice genome sequence*. Mol. Breed. 9, 245-250.
- Fan C.C., Yu X.Q., Xing Y.Z., Xu C.G., Luo L.J., Zhang Q. 2005. *The main effects, epistatic effects and environmental interactions of QTLs on the cooking and eating quality of rice in a doubled-haploid line population*. Theor. Appl. Genet. 110, 1445-1452.
- Garland S., Lewin L., Blakeney A., Reinke R. 2000. *PCR-based molecular markers for the fragrance gene in rice (Oryza sativa L.)*. Theor. Appl. Genet. 101, 364-371.
- Kibria K., Islam M.M., Begum S.N. 2008. *Screening of aromatic rice lines by phenotypic and molecular markers*. Bangladesh J. Bot. 37, 141-147.
- Kumar I., Khush G.S. 1986. *Genetics of amylose content in rice (Oryza sativa L.)*. J. Genet. 65, 1-11.
- McClung A.M., Chen M., Bergman C.J., Fjellstrom R.G. 2005. *Determining rice cooking, processing, and sensory quality through the use of genetic markers*. American Association of Cereal Chemists Meeting. [http://www.ars.usda.gov/research/publications/publications.htmSEQ\\_NO\\_115=182793](http://www.ars.usda.gov/research/publications/publications.htmSEQ_NO_115=182793)
- Mestres C., Matencio F., Pons B., Yajid M., Flíedel G. 1996. *A rapid method for the determination of amylose content by using differential scanning calorimetry*. Starch. 48, 2-6.
- Narayanan N.N., Baisakh N., Vera Cruz C.M., Gnanamanickam S.S., Datta K., Datta S.K. 2002. *Molecular breeding for the development of blast and bacterial blight resistance in rice cv. IR50*. Crop Sci. 42, 2072-2079.
- Ruiz C., Bretó M.P., Asins M.J. 2000. *A quick methodology to identify sexual seedlings in citrus breeding programs using SSR markers*. Euphytica. 112, 89-94.
- Saktivel K., Shoba Rani N., Pandey M.K., Sivaanjan A.K.P., Neeraja C.N., Balachandran S.M., Sheshu Madhav M., Viraktamath B.C., Prasad G.S.V., Sundaram R.M. 2009. *Development of a simple functional marker for fragrance in rice and its validation in India basmati and non-Basmati fragrant rice varieties*. Molec. Breed. 24, 185-190.
- Sanchez A.C., Brar D.S., Huang N., Li Z., Khush G.S. 2000. *Sequence tagged site marker-assisted selection for three bacterial blight resistance genes in rice*. Crop Sci. 40, 792-797.
- Tan Y.F., Li J.X., Yu S.B., Xing Y.Z., Xu C.G., Zhang Q. 1999. *The three important traits for cooking and eating quality of rice grains are controlled by a single locus in an elite rice hybrid, Shanyou 63*. Theor. Appl. Genet. 99, 642-648.
- Villareal C.P., de la Cruz N.M., Juliano B.O. 1994. *Rice amylose analysis by near-infrared transmittance spectroscopy*. Cereal Chem. 71, 292-296.
- Wang P., Zhou G., Yu H., Yu S. 2011. *Fine mapping a major QTL for flag leaf size and yield-related traits in rice*. Theor. Appl. Genet. 123, 1319-1330.
- Webb B.D. 1985. *Criteria of rice quality in the United States*. pp. 403-442. En: Rice Chemistry and Technology. Ed: Juliano B.O. American Association of Cereal Chemists, St Paul, Minnesota.
- Weber J.L., May P.E. 1989. *An abundant new class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction*. Am. J. Hum. Genet. 44, 388-396.
- Zhou P.H., Tan Y.F., He Y.Q., Xu C.G., Zhang Q. 2003. *Simultaneous improvement for four quality traits of Zhenshan 97, an elite parent of hybrid rice, by molecular marker-assisted selection*. Theor. Appl. Genet. 106, 326-331.

# La empresa almeriense Phycoelementa comercializa un nuevo fertilizante biológico para cítricos y olivos

La empresa almeriense Phycoelementa, cuyo presidente es **Ignacio Flores Sánchez**, está comercializando dos nuevas variedades de su fertilizante biológico "Mash", que han sido especialmente creadas y diseñadas para los cultivos de cítricos y olivar.

"**Mash cítricos**" y "**Mash olivos**" son dos productos muy ricos en oligoelementos, que se manifiestan como correctores de las carencias de suelo, ya que son capaces de actuar en cualquier tipo de terreno, incluso si posee condiciones desfavorables, como bajo contenido en materia orgánica.

Del mismo modo, aumenta el número y el tamaño de los frutos de cada árbol permitiendo que el calibre sea homogéneo, lo que facilita al productor su recolección y posterior comercialización.

Las investigaciones efectuadas por Phycoelementa han determinado, también, que el fertilizante biológico "Mash cítricos" y "Mash olivos" aumenta considerablemente el número de raíces de la planta y las hace más fuertes, por lo que potencia la fijación de la planta al suelo y la absorción de agua y sales minerales.

Explica Ignacio Flores que "Mash" es un fertilizante a base de microalgas con oligoelementos y que con su uso se ha comprobado un descenso de hasta el 30%

en la necesidad de aportes de fertilizantes químicos, lo que supone un considerable ahorro para el agricultor. "Además, estos biofertilizantes son naturales y compatibles con cultivos de producciones integradas y ecológicas. También potencian el sabor de los hortofrutícolas. Las flores -añade- con más feromonas atraen más a las abejas y a mayor polinización más sabroso y duro es el fruto".

En los cítricos, "Mash" corrige las carencias de zinc, hierro y manganeso de los cultivos, mejora el estado sanitario de la planta y estimula el crecimiento de las raíces; es decir, el fertilizante biológico mejora las cosechas tanto en cantidad como en calidad, aumentando por tanto su valor en la comercialización.

Por su parte, el fortificante "Mash" para olivos es una mezcla de abono mineral complejo y boro, enriquecido con extracto de algas cianobacterias. Estimula el crecimiento del olivo, favorece el cuajado y evita la caída prematura de los frutos, mejorando, también, la cosecha en cantidad y calidad.

En líneas generales, el fortificante biológico "Mash", de Phycoelementa, controla las deficiencias de calcio en las frutas y en las hortalizas para asegurar la calidad de las cosechas. Está compuesto a base de nitrato de calcio con hidrolizado de algas cianobacte-

rias apartador de microelementos quelados de forma natural, cuyo fin es favorecer la asimilación del calcio. Phycoelementa ha desarrollado "Mash" para ser empleado en cualquier cultivo, y en el caso del tomate y del pimiento combate la "podredumbre apical", en la lechuga la falta de calcio y en el manzano el "bitter pit".

La empresa almeriense Phycoelementa recomienda que el fortificante biológico se aplique en una dosis de cinco litros por hectárea de cultivo y en el caso de los olivos es aconsejable dar tres o cuatro aplicaciones coincidiendo con las etapas de mayor requerimiento nutricional: brotación, floración, cuajado y maduración de los frutos.

La investigación tecnológica de Phycoelementa, que ha llevado a la producción y comercialización del biofertilizante biológico y orgánico "Mash", procede del desdoblamiento de las moléculas de compuestos orgánicos por acción del agua; recordemos que la empresa cubana Genix ya ha llegado a un acuerdo con la almeriense Phycoelementa para producir este compuesto en La Habana y abastecer a la propia isla y a América Latina.

Más información;  
**Phycoelementa**. - Tel.: 950 22 06 12